基于慢病毒系统的双荧光标记多功能自噬流监测系统建立与应用*

马占兵[1,2], 党洁[1,2]，杨继辉[3]，霍正浩[1,2*], 徐广贤[4*]

([1]宁夏医科大学基础医学院医学遗传系与细胞生物学系 银川 750004 [2]宁夏回族自治区生育力保持教育部重点实验室 银川 750004 [3]宁夏医科大学科技中心 银川 750004

[4]宁夏医科大学临床医学院，银川 750004)

摘要 目的 构建能够用于稳定动态监测细胞自噬流变化和过表达基因的红色荧光蛋白-绿色荧光蛋白-鼠源 LC3 融合慢病毒多功能表达载体(PCDH-Duo-mRFP-eGFP$_{ph}$-LC3$_{rat}$，PCDH-Duo)，并构建小鼠腹腔巨噬细胞 Raw264.7 稳转株观察自噬流变化。**方法** 应用基于 PCR 精确合成 mRFP-eGFP$_{ph}$-LC3$_{rat}$ 融合全基因，将其克隆至慢病毒表达载体 PCDH-CMV-MCS-EF1a-GFP 中，重组质粒经菌落 PCR、酶切及测序分析正确无误后，包装慢病毒，转染 Raw264.7 细胞，并利用流式分选术获取稳转株，经氯喹抑制自噬模型及 Western blotting 鉴定 eGFP 蛋白表达确认其可靠性。**结果** 成功构建了 PCDH-Duo 重组慢病毒质粒，包被慢病毒并获得 Raw264.7 稳定细胞系(Raw264.7-PCDH-Duo)，可稳定表达双荧光蛋白，经 3 mM 氯喹作用 6h 后，能够稳定准确指示自噬流变化。**结论** 成功构建了基于慢病毒系统的双荧光标记多功能自噬流监测系统，为研究细胞自噬与编码基因及非编码基因之间的关系提供了方便有力的工具。

[关键词] 自噬流 载体构建 慢病毒 mRFP-eGFP-LC3

Establishment and application of dual fluorescent labeling multi-functional autophagy flux monitoring system based on lentiviral system*

Ma Zhanbing[1,2], Dangjie[1,2], Yang Jihui[3], HuoZhenghao[1,2*],XuGuangxian[4*]

[1] Department of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004; [2] Key Laboratory of Fertility Conservation of Ministry of Education, Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004; [3]Science and Technology Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004; [4]Clinical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004

Abstract **Objective** To construct a red fluorescent protein-green fluorescent protein-murine LC3 fusion multi-lentiviral expression vector (PCDH-Duo-mRFP-eGFP$_{ph}$-LC3$_{rat}$, PCDH-Duo),which can be used to stably monitor the changes of autophagy flux and overexpression genes . Changes in autophagic flow were observed in the mouse peritoneal macrophage Raw264.7 stable strain. **Methods** The mRFP-eGFPph-LC3rat fusion gene was synthesized by PAS and cloned into the lentiviral expression vector PCDH-CMV-MCS-EF1a-copGFP. After the recombinant plasmid was correctly analyzed by PCR, enzyme digestion and sequencing, the lentivirus was packaged. Raw264.7 cells were transfected, and stable cells were obtained by FACS. The reliability of the eGFP protein expression system was confirmed by CQ autophagy inhibition model and Western blotting. **Results** The recombinant plasmid of PCDH-Duo lentivirus was successfully constructed, which was coated with lentivirus and obtained stable cell line of Raw264.7. The expression of double fluorescent protein was stable. After induction by 3 mM CQ for 6 h, it was stable and accurate. The phasing changes. **Conclusion** The dual-fluorescence multi-function autophagic flux monitoring system based on lentivirus system was successfully constructed, which provides a convenient and powerful tool for studying the relationship between autophagy and coding genes and non-coding genes.

Key words Autophagic Flux Vector construction Lentivirus mRFP-eGFP-LC3

基金项目：宁夏回族自治区自然科学基金面上项目(2018AAC03088)

作者简介：马占兵(1986 年 4 月)，男，宁夏，讲师，博士，E-mail：mabing_516@163.com

*通讯作者：霍正浩(huozhh@163.com) 徐广贤(xuguangxian@nxmu.edu.cn)

自噬是真核细胞内依赖于膜介导途径，由自噬体包裹大分子物质传递给溶酶体，形成自噬性溶酶体以实现内容物降解而循环利用的代谢过程。研究发现，自噬在维持细胞内稳态，增殖和分化、免疫以及解除非正常聚集蛋白毒性等方面具有着重要作用[1]。细胞自噬是一个快速连续动态发生的过程，主要包括起始、延生和融合三个阶段，任何单点的研究都无法反映出自噬全貌[2]。因此，需要动态观察自噬潮的发生。目前检测细胞自噬发生，主要是通过透射电镜观察细胞自噬体和自噬性溶酶体的数量及结构[3]、免疫荧光观察内源性 LC3 点状聚集[4]、外源性融合蛋白 GFP-LC3 点状聚集[5]及内源性 LC3 与溶酶体膜相关蛋白(Lamp1\Lamp2) 免疫荧光共定位分析[6]、Western Blot 分析自噬标志性蛋白，包括自噬底物 P62、起始复合物组份 BECN1,ATG5，ATG16L1 及 p62 等[7]。上述研究体系，存在的主要问题有：一是不能实时动态观察自噬的发生，同时，对于一些干细胞、原代细胞、免疫细胞及难以传代培养且转染外源性质粒难度较大，不容易建成稳定细胞系，制约了相关研究的发展。二是，上述技术体系无法反映出自噬发生的顺序和阶段，更无法定量分析细胞自噬的强度。三是，无法实现细胞内外源性基因过表达与自噬检测时空同步，影响研究结果准确性。

在自噬示踪研究中，酵母 ATG8 的人源同系基因 LC3 是一种被广泛使用的胞内蛋白标记物，存在泛素样翻译后修饰过程[8]。胞浆型 LC3 呈弥散分布，自噬发生时，LC3 前体 C 端首先被 Atg4b 剪切形成可溶态的胞浆型 LC3-I(14 kDa)，后经 ATG7 和 ATG3 泛素样修饰，LC3-I 被磷脂酰乙醇胺（PE）修饰形成锚定在自噬溶酶体内膜与外膜上的膜结合脂质态的 LC3-II（16 kDa），可形成点状聚集[9]。LC3-II 是一种良好的监视自噬体形成的标记物，使用 GFP 或者 RFP 标记 LC3 蛋白后，结合活细胞成像或激光共聚焦分析，即可监测细胞自噬[10]。随着分子生物学的发展，已经产生了双色荧光标记自噬示踪体系，目前主要包括 mRFP-LC3-GFP 及 mRFP-EGFP-LC3 两种形式[11]。GFP 荧光对 pH 的变化比较敏感，在溶酶体腔内的酸性环境中容易发生荧光淬灭，而 mRFP 等红色荧光蛋白则能相对稳定存在。据此可设计出 mRFP-GFP-LC3 融合蛋白，用于监测自噬体与溶酶体融合这一重要过程，监测自噬潮。GFP 和 RFP 信号共定位（不重叠），代表未与溶酶体融合的细胞结构，比如自噬体以及吞噬体。相反，如果 RFP 信号未能与 GFP 共定位，则代表已经与溶酶体融合了的细胞结构，如自噬溶酶体以及自噬内涵体等。同时，上述体系，结合相应的图像算法可准确定量酸化的细胞成分[12]。

本研究基于以上背景，检索已发表 mRFP，EGFP 及 LC3 序列，经过同源比对、EGFP 碱基抗酸修饰优化，PAS 融合基因合成，亚克隆至慢病毒表达载体 PCDH-CMV-MCS-EF1a-GFP 中，构建双荧光标记慢病毒自噬流载体，包装慢病毒、转染 Raw264.7 细胞系并经流式分选构建稳转株，Western Blot 检测融合蛋白表达及 CQ 抑制细胞自噬模型确认系统有效性，为后续研究基因及非编码 RNA 分子调控细胞自噬奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料 无内毒素质粒提取试剂盒(DP-100)购自天根公司；全蛋白提取试剂盒(KGP1050-KGP10100)购自凯基生物技术公司；GFP 兔抗鼠标签抗体 (66002-1-Ig) 购自 Proteintech 公司；FITC 标记山羊抗兔抗体 IgG 购自中杉金桥公司；限制性内切酶 *Xba I* 和 *Sal I*，连接 Mix，PCR Mix 均购自 Takara 公司；DMEM 高糖培养基、磷酸缓冲液（PBS）、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) 购自 BI 公司；氯喹(Chloroquine，CQ）购自 Sigma 公司；丙酮酸钠，GlutaMax，Lip3000 均购自 Thermo Fisher 公司；酵母粉，葡萄糖，NaCl，PEG-8000 均购自 Sigma 公司；小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7,293T,菌株 Top10 和 Stbl3，慢病毒表达质粒 PCDH-CMV-MCS-EF1a-CopGFP，辅助包装质粒 pLp.1、pLp.2 及 VSV.G 均由本实验室保存；主要生物分析软件包括 Tbtools、Vector NTI 11、Chromas 及 FV1000-ASW；主要仪器包括荧光倒置显微镜(奥林巴斯-IX71,日本)，激

光共聚焦显微镜（奥林巴斯 FV-1000，日本），FACS 流式细胞仪为(BD Calibur,USA)。

1.2 方法

1.2.1 mRFP-EGFP-LC3rat 慢病毒表达质粒设计 检索 Pubmed 已发表 mRFP 及 EGFP 序列及 Addgene 鼠源 LC3 序列，经多序列比度确定各基因 CDS 区，同时，参照文献[13]优化 EGFP 11 个氨基酸位点并优化 MCS 位点，引入 AgeI 酶切位点。融合基因序列原件顺序为：5'-Xba*I*-MCS-mRFP-Linker1-EF1a-eGFP-Linker2-LC3rat-Sal*I*-3'，全长 2559 bp，融合基因 CDS 编码蛋白质大小约为 71 kDa。

1.2.2 PAS 全基因合成，酶切、连接、转化及测序验证 将设计序列交由南京钟鼎生物技术公司经基于 PAS(PCR-based Accurate Synthesis)的方法进行全基因合成，经 Xba *I*、Sal *I* 双酶切亚克隆至 PCDH-MCS-EF1a-CopGFP 载体中，转化筛选重组质粒，PCR 确定阳性克隆、酶切鉴定分析。经测序确认载体构建成功，命名为 PCDH-Duo，提取重组质粒，纯化溶解，-20℃保存。测序引物见表 1。

表 1 载体全长基因测序引物

Table1 Sequencing primer for full-length gene

Primer ID	Name	Sequence (5'-3')
P1	Cmv-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
P2	mRFP-EGFP-LC3-Seq1	GCCGTTACAGATCCAAGC
P3	mRFP-EGFP-LC3-Seq2	ACGCTGAGGTCAAGACCA
P4	mRFP-EGFP-LC3-V-seqR	TGAAAGCCATACGGGAAG

1.2.3 慢病毒包装及滴度测定 经天根无内毒素质粒大提试剂盒获取高纯度的表达质粒 PCDH-Duo，辅助包装质粒 pLp1，pLp2 及 VSV.G，测定浓度后，并按照质粒体积质量比（pLp1:pLp2:VSV.G=1:2:1）制备 ViralMix,表达质粒与 ViralMix 等比例混合，包装步骤详细参见 Lip3000 生产慢病毒说明书。采用 PEG-8000 法浓缩病毒，具体在用 0.45 微米滤器过滤病毒上清液，每 30 ML 原始病毒上清液加入 5×PEG-8000-Nacl 母液 7.5 mL，每 20 min 轻微混匀一次，共进行 3-5 次，4 ℃过夜，次日 4℃ 4000g 离心 20 min,吸弃上清，加入适量含 5% FBS 的 PBS 轻微溶解病毒沉淀，分装-80℃保存。病毒滴度采用有限稀释法测定[14]。

1.2.4 双荧光 Raw264.7 巨噬细胞稳转株获得 按照所测滴度，计算合适的 MOI 并感染细胞。六孔板中感染后的 Raw264.7 细胞，消化合并扩大培养至 T-25 培养瓶，等待细胞汇合度达到 90%，荧光显微镜观察细胞状态及荧光密度，随后消化细胞，经 DMEM 培养基完全悬浮，过 400 目无菌纱网，制备流式分选细胞悬液。消化细胞悬液总体积不超过 2 mL，随后 FACS，DMEM 培养基作为空白对照，激发光波长设置为 470nm，按照仪器操作程序进行细胞分选，分选后的细胞培养至六孔板中，最后扩大培养，多次 FACS 分选后完成稳转株建立。

1.2.5 稳转株 EGFP 蛋白表达检测 为明确慢病毒已将融合基因整合进入 Raw264.7 细胞基因组，我们按照 10^5 个细胞每孔的比例，将 Raw264.7-PCDH-Duo 细胞接种于 6 孔板，同时设置 Mock(未转染)组。DMEM 完全培养基，培养 24 h 后收集细胞样品，提取全蛋白经 BCA 法定量，Western blot 检测细胞中 mRFP-eGFP-LC3rat 融合蛋白的表达情况。

1.2.6 氯喹抑制 Raw264.7 细胞自噬模型 为验证细胞系能否以双荧光的方式正确指示自噬发生顺序，实现自噬潮监测。我们将 Raw264.7-PCDH-Duo 细胞按照 每孔 5×10^4 个密度铺 24 孔板，完全培养 12 h 后，实验组（n=3）更换为含 3 mM CQ 的 DMEM 培养基，对照组更换为 DMEM 完全培养基。6 h 后抑制自噬完毕，经 4%多聚甲醛固定，激光共聚焦显微镜检测组间荧光聚集状况。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS 21 软件包进行数据分析。荧光聚集点等计数资料采用 ImageJ 直接计数法计算，组间数据比较依据资料的性质，采用 t 检验或方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mRFP-EGFP-$LC3_{rat}$ 慢病毒质粒设计

重组慢病毒载体图谱如图 1 所示：载体全长 8692bp，其中，MCS 区引入 AgeI 酶切位点，EF1a 启动子末端引入 Xho*I*(609)酶切位点，方便更换指示原件。载体 CMV 启动子独立驱动外源基因表达，可用于 miRNA 前体序列，LncRNA 及编码基因全长表达。EF1a 独立驱动自噬潮指示系统。经同源建模表明，序列能够正确表达各个原件。

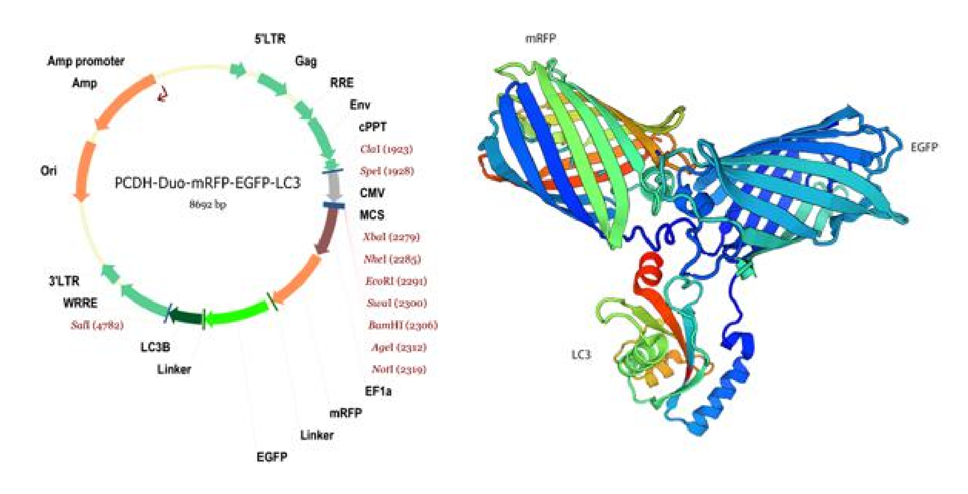


图 1　重组载体图谱及蛋白同源建模

Figure 1 Recombinant vector map and protein homology modeling

2.2　PAS 全基因合成，重组转化菌落 PCR 鉴定、酶切及测序验证

PAS 全基因合成结果表明，获得大小为 2559 bp 融合基因片段。菌落 PCR 鉴定表明 1 号，2 号和 4 号为阳性克隆。挑取扩大培养提取质粒经 SPEI 和 SalI 双酶切分析后，获得了正确大小的片段和骨架。经 Sanger 测序法，确定克隆序列与设计序列一致无误，可继续进行下游病毒包装实验。

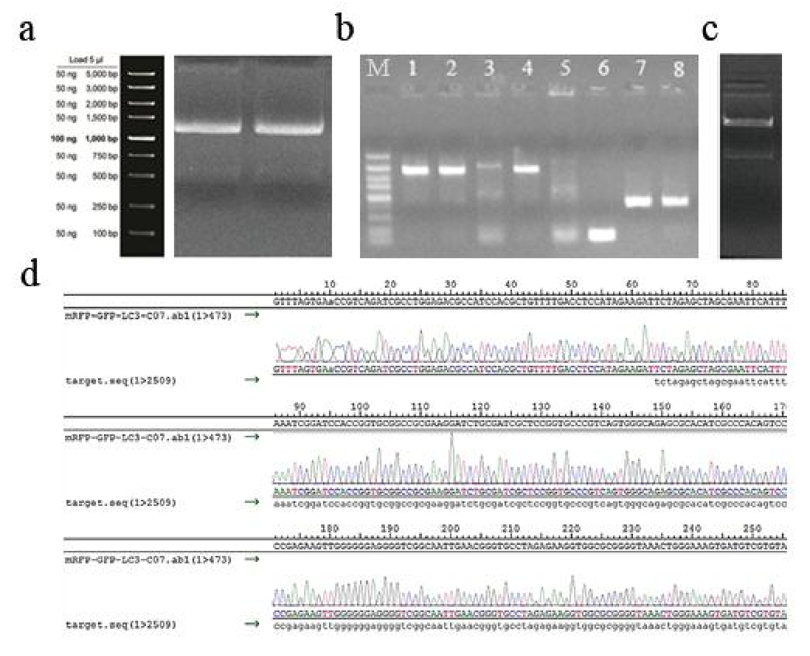


图 2　全长融合基因 PAS 合成（a）、菌落 PCR 鉴定(b)、限制性内切酶分析(c)及测序验证(d)

Figure 2 Full-length fusion gene synthesis via PAS (a),colony PCR identification (b), restriction endonuclease analysis (c) and sequencing verification (d)

2.3　慢病毒包装及滴度测定

病毒包装 48h 后，荧光镜检可见 293T 双荧光阳性率约为 70%（图 3）。72h 后，与 48h 上清液合并离心过滤，PEG-8000 法浓缩，采用有限稀释法测定病毒滴度，所获病毒滴度达到 2×10^7 TU/mL，能够用于下游实验。

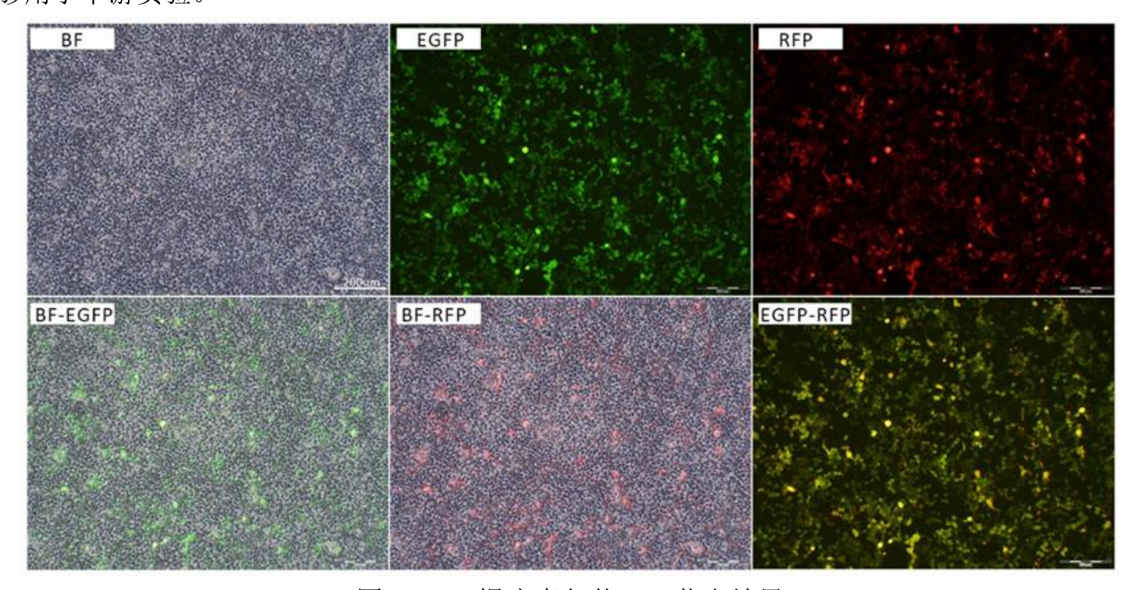


图 3 293T 慢病毒包装 48h 荧光结果

Figure 3 The fluorescence results of lentivirus packaging in 293T after 48h

2.4 双荧光 Raw264.7 巨噬细胞稳转株获得

按照流式分选细胞制样要求，制备细胞悬液，进行荧光分选。培养并多次荧光分选后，获得稳定细胞系。荧光检查结果显示（图 4），经 MOI=10 感染巨噬细胞 72h 后，可见约有 60% 的 Raw264.7 细胞表达两种荧光蛋白，转染效率远高于常规方法转染 Raw264.7 的转染效率(约为 15%)。FACS 分选结果显示(图 5)，在 470 nm 激发光波长下，分选阳性比例约为 55%，经阳性分选所获细胞命名为 Raw264.7-PCDH-Duo。

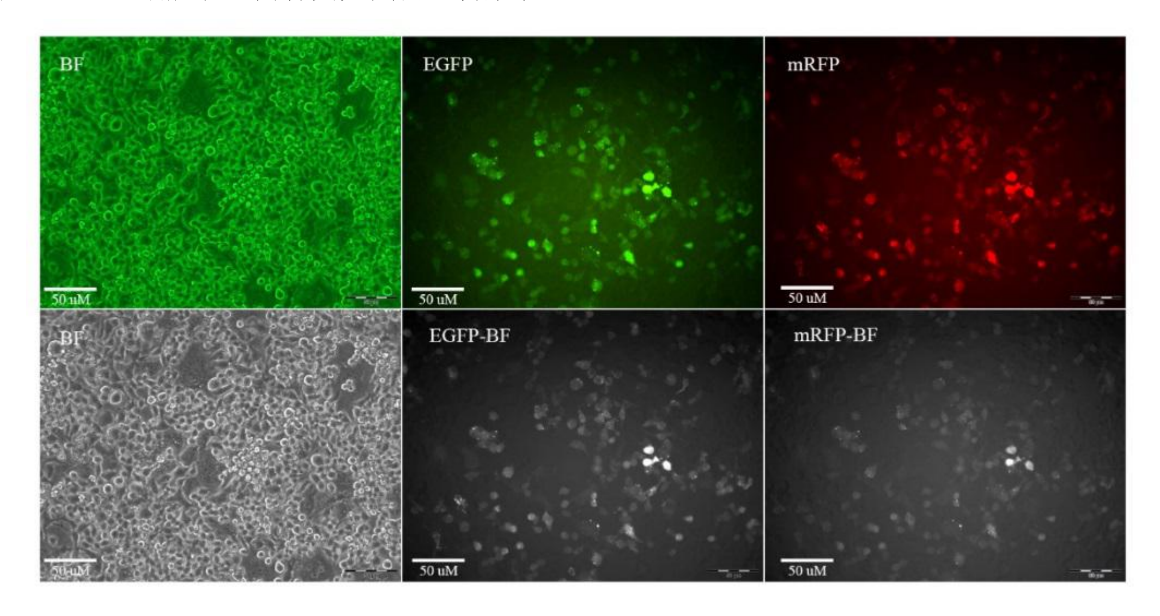


图 4 重组 PCDH-Duo 慢病毒(PCDH-Duo-Lv)感染 Raw264.7 细胞 72h 结果（MOI=10）

Figure 4 The results of Raw264.7 infected with PCDH-Duo-Lv at 72h (MOI=10)

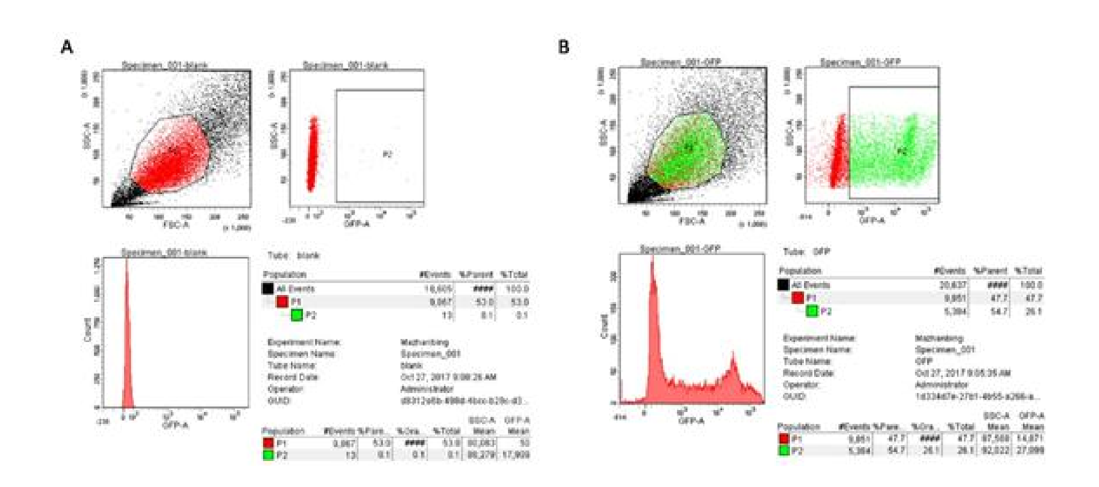


图 5 流式分选双荧光标记的 Raw264.7 细胞

Figure 5 Flow Cytometry of dual fluorescently labeled Raw264.7 cells

2.5 稳转株 EGFP 蛋白表达检测

结果显示 Raw264.7-PCDH-Duo 细胞系中有 mRFP-EGFP-LC3 融合蛋白质的表达，而阴性对照组则没有该蛋白质的表达（图 6），说明重组慢病毒已成功将目的融合基因稳定整合进入 Raw264.7 基因组中。

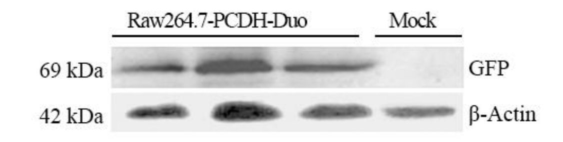


图 6 EGFP 蛋白表达检测(Mock:Raw264.7)

Figure 6 Detection EGFP through Western Blot

2.6 Raw264.7 氯喹抑制细胞自噬模型验证

较对照组细胞，由于自噬未受到抑制，细胞内红色及绿色的荧光蛋白分散在细胞质中。由于发生本底自噬，细胞中仅有少量荧光聚集点出现。而实验组 CQ 抑制溶酶体与自噬体的结合，抑制自噬下游阶段，致使细胞内荧光点发生聚集（红色聚集点增多），并且由于自噬体与溶酶体未能有效融合形成自噬性溶酶体，无酸性环境，mRFP 与 EGFP 发生了共定位，Merge 形成大量的黄色荧光聚集点（图 7A），荧光聚集点数目较对照组具有统计学意义（图 7B，P<0.05）。Western blot 检测 LC3 I/II 转换，表明 LC3 II 切割成熟，CQ 显著提高 LC3 的表达水平，表明 Raw264.7 稳转株可在活体水平上有效的指示自噬发生状况。

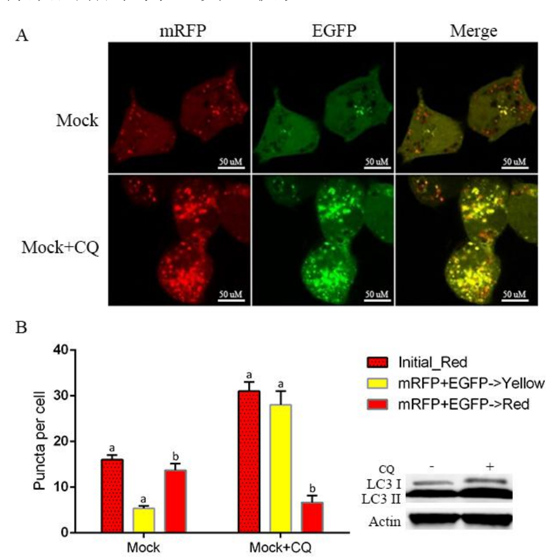


图 7 CQ 抑制 Raw264.7-PCDH-Duo 稳转株自噬模型自噬潮检测（Mock:Raw264.7-PCDH-Duo，a P<0.01, b p<0.05）

Figure 7 Autophagy flux detection in CQ inhibition of Raw264.7-PCDH-Duo stable cell model（Mock: Raw264.7-PCDH-Duo，a P<0.01, b P<0.05）

3 讨论

细胞自噬由四个阶段组成，是一个快速动态的过程。因此，细胞自噬的检测技术也应该分为静态技术和动态技术。静态技术检测依赖于细胞自噬的诱导，检测的是细胞自噬的结局，而不能判定细胞自噬的过程。动态检测技术检测则依赖于自噬的过程检测，关注的是自噬的过程及顺畅与否。

目前静态技术主要包括透射电子显微镜技术、ATG5/ATG12/BECN1/P62/LC3 蛋白质免疫

印迹检测技术、LC3 免疫荧光技术、TOR\ATG1 激酶活性测定技术、转录水平的 mRNA 检测（Northern Blot 或 RT-qPCR）及单磺酰戊二胺(MDC)染色等。特别的，针对 LC3 蛋白的 WB，抗体非常关键，有些抗体识别 LC3-I 的能力有限（灵敏度），就会造成 LC3-I 显著低于 LC3-II 的现象，造成错误实验结果，因此，要多指标复合检测。相对于上述静态技术，动态技术更合适对自噬发生发展过程观察和分析。这类技术包括 P62 荧光素酶报告系统[15]、荧光小分子标记示踪[16]、氨基酸放射素掺入标记检测[17]、LC3-II 的转化分析[18]、GFP-LC3 溶酶体运输和降解分析[19]、自噬体-细胞器共定位分析，包括 Lamp2 标记溶酶体[20]、LysoTracker(LTR)溶酶体探针[21]、pDSRed2-mito 线粒体蛋白[22]、JC-1 探针[23]，多光谱成像流式细胞术测量 LC3，p62 和 LAMP1 共定位来评估自噬通量[24]、绿色荧光蛋白与红色荧光蛋白结合的激光共聚焦分析[25]或活细胞成像分析[26]。特别的，对于 RFP-GFP-LC3 的双色荧光系统，相比 GFP，RFP 对溶酶体腔的酸和（或）蛋白水解环境较为稳定。共定位一般会出现两种结局，如果 GFP 和 RFP 荧光共定位提示某一组分尚未与溶酶体融合，如自噬体或吞噬泡。相反，有 mRFP 信号而缺乏 GFP 时，则符合水解体或自噬溶酶体特征，如果结合第三色细胞器标记荧光物，如 Lamp2，则上述检测则能很好的完成自噬过程的检测及定量（荧光斑点）。缺点在于，需要优化 GFP 的酸敏感性、解决背静自噬水平及自动观察分析方面的问题[27]。

同时，对于原代细胞、免疫细胞等细胞系，由于较难转染，会对实验带来很大影响，包括结果的重现性。已有商品化的携带双色荧光标记的腺病毒及昆虫杆状病毒系统，但不能用于建立稳转细胞系。mRFP-EGFP-LC3 稳转细胞株可以稳定持续的表达标记分子,能够有效地解决瞬转实验的效率低、周期长、操作繁琐、不稳定等问题,有利于提高研究结果稳定性和可靠性。

本研究结合慢病毒的技术优势及相关研究需要，构建了基于慢病毒的双色荧光标记系统及 Raw264.7 稳转株，该系统将外源基因过表达问题考虑在内，实现单次转染或感染，同步实现过表达和自噬监控，消除了时空不同步性和多次转染等可变因素对实验准确性和可靠性产生的影响，利于自噬研究。自噬流顺畅与否,对于细胞生理功能的稳定极其重要，mRFP-GFP-LC3 双荧光慢病毒自噬指示体系结合活细胞成像及激光共聚焦观察，能够很好的动态实时观察活体细胞自噬流监测。未来，更可将标记系统更换为基于荧光素酶的报告系统，有望实现基于外源基因过表达(LncRNA)、siRNA,mimics 等高通量筛选影响自噬的基因、ncRNA、小分子等，对自噬研究具有一定的促进作用。

综上所述，本研究成功建立了一种基于慢病毒的双荧光标记多功能自噬流研究系统，可同时用于表达外源目的基因及完成自噬流监测，并可方便构建 Raw264.7 稳转株，是对已有 RFP-GFP-LC3 体系及其 RAW264.7 稳转株的优化[28]，为高通量检测自噬潮提供了更加优化的技术平台。

[参考文献]

[1]. Highlighting advances in autophagy. Nature cell biology, 2018, 20(3): 223-223.

[2]. Gottlieb RA, Andres AM, Sin J, et al. Untangling autophagy measurements: all fluxed up. Circulation research, 2015, 116(3): 504-514.

[3]. Hurley JH, Nogales E. Next-generation electron microscopy in autophagy research. Current opinion in structural biology, 2016, 41: 211-216.

[4]. Kimura S, Fujita N, Noda T, et al. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. Methods in enzymology, 2009, 452: 1-12.

[5]. Ktistakis NT. Monitoring the Localization of MAP1LC3B by Indirect Immunofluorescence. Cold Spring Harbor protocols, 2015, 2015(8): 751-755.

[6]. Shen ZY, Xu LY, Li EM, et al. Autophagy and endocytosis in the amnion. Journal of structural biology, 2008, 162(2): 197-204.

[7]. Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2010, 648:

193-214.
[8]. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. The EMBO journal, 2000, 19(21): 5720-5728.
[9]. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004, 36(12): 2503-2518.
[10]. Bhutia S.K. Prakash P. Praharaj. et al. Autophagy in Differentiation and Tissue Maintenance. Methods in Molecular Biology, New York: Humana Press,2018: 209-222.
[11]. Zhou C, Zhong W, Zhou J, et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. Autophagy, 2012, 8(8): 1215-1226.
[12]. Tang ZH, Cao WX, Wang ZY, et al. Induction of reactive oxygen species-stimulated distinctive autophagy by chelerythrine in non-small cell lung cancer cells. Redox biology, 2017, 12: 367-376.
[13]. Mahon MJ. pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green florescent protein. Advances in bioscience and biotechnology (Print), 2011, 2(3): 132-137.
[14]. Sena-Esteves M, Gao G. Titration of Lentivirus Vectors [J]. Cold Spring Harbor protocols.2018, 2018(4):pdb.prot095695.
[15]. Min Z, Ting Y, Mingtao G, et al. Monitoring autophagic flux using p62/SQSTM1 based luciferase reporters in glioma cells. Experimental cell research, 2018, 363(1): 84-94.
[16]. Iwashita H, Sakurai HT, Nagahora N, et al. Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux. FEBS letters, 2018, 592(4): 559-567.
[17]. Gretzmeier C, Eiselein S, Johnson GR, et al. Degradation of protein translation machinery by amino acid starvation-induced macroautophagy. Autophagy, 2017, 13(6): 1064-1075.
[18]. Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice, 2017, 13(10): 1619-1628.
[19]. Adiseshaiah PP, Skoczen SL, Rodriguez JC, et al. Autophagy Monitoring Assay II: Imaging Autophagy Induction in LLC-PK1 Cells Using GFP-LC3 Protein Fusion Construct. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2018, 1682: 211-219.
[20]. Lina TT, Luo T, Velayutham TS, et al. Ehrlichia Activation of Wnt-PI3K-mTOR Signaling Inhibits Autolysosome Generation and Autophagic Destruction by the Mononuclear Phagocyte, 2017, 85(12): 690-707
[21]. Bampton ET, Goemans CG, Niranjan D, et al. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. Autophagy, 2005, 1(1): 23-36.
[22]. Koo V, Lee A, Eldin OS, et al. pcDNA3.1tdTomato is superior to pDsRed2-N1 for optical fluorescence imaging in the F344/AY-27 rat model of bladder cancer. Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging, 2010, 12(5): 509-519.
[23]. Zhu BS, Yu LY, Zhao K, et al. Effects of small interfering RNA inhibit Class I phosphoinositide 3-kinase on human gastric cancer cells. World journal of gastroenterology, 2013, 19(11): 1760-1769.
[24]. Pugsley HR. Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. J Vis Exp. 2017 (125): 55637-55637.
[25]. Maulucci G, Chiarpotto M, Papi M, et al. Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates. Autophagy, 2015, 11(10): 1905-1916.

[26]. Hale CM, Cheng Q, Ortuno D, et al. Identification of modulators of autophagic flux in an image-based high content siRNA screen . Autophagy, 2016, 12(4): 713-726.
[27]. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) . Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.
[28]. 王婉, 张庆, 赵润鹏, 等. 稳定表达RFP-GFP- LC3的RAW264.7细胞株的建立. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(9): 1175-1179.

Wang W, Zhang Q, Zhao RP, et al. Establishment of RAW264.7 cell line stably expressing RFP-GFP-LC3. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2015, 31(9): 1175-1179.